

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861546

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるDigital PCR装置を使ったメチル化解析法の確立

研究課題名(英文) Methylation analysis by using digital PCR in head and neck cancer

## 研究代表者

遠藤 志織 (Endo, Shiori)

浜松医科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10625205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、DNAのメチル化を始めとするエピジェネティックな変化が、RNA合成、ひいてはタンパク質の発現を抑制することから、癌化機構の一つとして広く認識されている。2012年春、第三世代PCR機といわれるDigital PCR装置が世界で販売開始され、従来のリアルタイムPCRによる検出と比べ決定的な感度と精度に差があるとされている。今回我々は、SALL3遺伝子のDigital PCR装置を使ったメチル化解析を行い、メチル化解析に有効な方法であること調べた。

研究成果の概要(英文)：Bisulfite-treated DNA was amplified by PCR with two designed pairs of methylation-specific PCR primers for the promoter region of the SALL3 gene. Two million PCR reactions using conventional TaqMan assays with a 96-well plate workflow. Three applications demonstrate that the massive partitioning afforded by our ddPCR system provides orders of magnitude more precision and sensitivity than real-time PCR. ddPCR system will allow researchers to explore complex genetic landscapes, discover and validate new disease associations, and define a new era of molecular diagnostics.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：Digital PCR法 メチル化解析 頭頸部癌

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の治療は、現在、外科的治療を中心に放射線治療・化学療法が行われている。最近の新しい放射線治療・抗癌剤・分子標的薬などにより、多くを占める進行例の局所制御率の向上がみられる。しかしながら、頭頸部癌全体の生存率改善までには至っておらず、新たな治療法・診断法の開発はもちろんのこと、予後因子や個別化治療のためのマーカーの確定や新しい解析方法の確立は頭頸部癌の予後改善のために重要と考える。

2. 研究の目的

近年、DNA のメチル化を始めとするエピジェネティックな変化が、RNA 合成、ひいてはタンパク質の発現を抑制することから、癌化機構の一つとして広く認識されている。2012 年春、第三世代 PCR 機といわれる Digital PCR 装置が世界で販売開始された。従来のリアルタイム PCR による検出と比べ決定的な感度と精度に差があるとされ、HPV をはじめとする微量ウイルスの検出、ウイルス量の定量解析に期待が集まっている。今回我々は、Digital PCR 装置を使ったメチル化解析を行い、今まで困難であった FFPE ならびに唾液からの DNA 微量サンプルからのメチル化解析の方法の確立を行い頭頸部癌のエピゲノム異常の知見を蓄積していきたい。

3. 研究の方法

本研究計画では、Digital PCR 装置を使ったメチル化解析の頭頸部癌への導入、メチル化解析方法の確立を行った。

- (1) Droplet Digital PCR 装置のメチル化解析への導入
- (2) 手術検体を使つての安定したメチル化解析の確立、従来法との比較
- (3) 頭頸部癌治療患者の予後マーカーとしてのメチル化遺伝子の評価

4. 研究成果

- (1) Droplet Digital PCR 装置のメチル化解析への導入

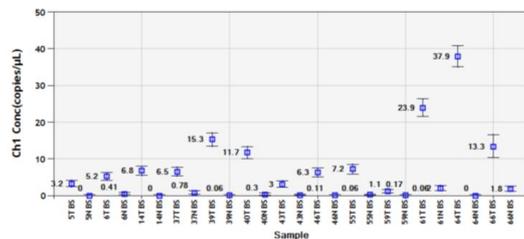


図 1 に示すように第三世代の Droplet Digital PCR は、Real-time PCR とコンセプトが異なり、微小区間に断片化されたサンプルを限界希釈して分散させ、ターゲット遺伝

子の PCR 増幅を行う。各微小区画は、増幅シグナルがポジティブないしネガティブとなり、そのポジティブの微小区間の数を直接カウントすることでサンプル中のターゲット遺伝子濃度を絶対的に測定できる方法である。図 1 では、まず Droplet Generator で圧力により約 20,000 個のドロプレットをチューブ内で作成する。

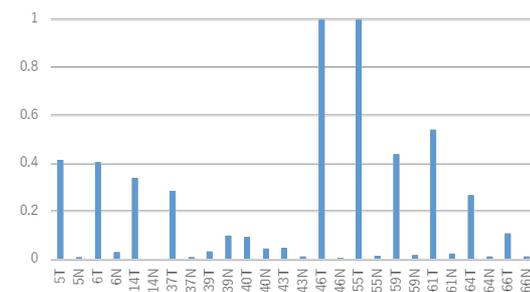
次に 2 で Thermal cycler にチューブを移し PCR 反応を行い蛍光させる。最後に 3 で Droplet Reader で蛍光を測定する。Digital PCR のデータは微小区間ごとにポジティブかネガティブかのどちらかになりこれをデジタル信号の 1/0 に見立てることによってデジタルと呼ばれている。

Droplet Digital PCR の利点は、限界希釈で行うため、サンプル中の PCR 阻害要因が軽減される。飽和するまでの PCR 増幅によって高い感度が得られる。ポジティブな微小区間を直接カウントするため、定量精度が高い。検量線を必要としない、などが挙げられる。



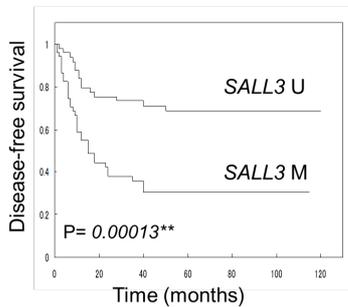
臨床検体を使つた Droplet Digital PCR 法による SALL3 遺伝子のメチル化解析の結果；上図に示す癌部(T)と非癌部(N)の比較により癌部で高メチル化なのが示された。

- (2) 手術検体を使つての安定したメチル化解析の確立、従来法との比較



臨床検体を使つた real time PCR 法による SALL3 遺伝子のメチル化解析の結果；上図に示す癌部(T)と非癌部(N)の比較により一部 ACTB との比較のため 1 を超えるメチル化を示したサンプルを認めた。

- (3) 頭頸部癌治療患者の予後マーカーとしてのメチル化遺伝子の評価



SALL3 遺伝子は高メチル化群で再発率が有意に高いことが示された。これらの結果から Droplet Digital PCR 法は、より安定的にメチル解析できる方法であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

1. Endo Shiori, Mizuta K\*, Takahashi G, Nakanishi H, Yamatodani T, Misawa K, Hosokawa S, Mineta H. The effects of ventilation tube insertion or trans-tympanic silicone plug insertion on a patulous Eustachian tube. *Acta Oto-Laryngologica*, 136(6):551-5. 2016
2. 遠藤 志織, 望月 大極, 杉山 健一, 岡村 純, 瀧澤 義徳, 高橋 吾郎, 三澤 清, 大和谷 崇, 細川 誠二, 峯田 周幸: 当科における甲状腺癌症例の検討 耳鼻咽喉科臨床 補冊 136 Page36-39, 2013
3. 遠藤 志織, 水田 邦博, 大和谷 崇, 峯田 周幸: 経外耳道生検により確定診断を得た錐体尖部神経鞘腫(図説) 耳鼻咽喉科臨床 108 巻 5 号 Page336-337, 2015
4. Misawa K\*, Kanazawa T, Misawa Y, Imai A, Uehara T, Mochizuki D, Endo Shiori, Takahashi G, Mineta H: Frequent promoter hypermethylation of tachykinin-1 and tachykinin receptor type 1 is a potential biomarker for head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*; 139:879-889, 2013
5. Misawa Y, Misawa K\*, Kanazawa T, Uehara T, Endo Shiori, Mochizuki D, Yamatodani T, Carey TE, Mineta H: Tumor suppressor activity and inactivation of galanin receptor type 2 by aberrant promoter methylation in head and neck cancer *Cancer* ; 120(2):205-213, 2014
6. Misawa K\*, Kanazawa T, Imai A, Endo Shiori, Mochizuki D, Fukushima H, Misawa Y, Mineta H: Prognostic value of Type XXII and XXIV collagen mRNA expression in head and neck cancer patients. *Molecular and Clinical Oncology* ; 2(2):285-291. 2014  
*PLoS ONE* ; 10(3):e0118588. 2015
7. Misawa K\*, Misawa Y, Kanazawa T, Mochizuki D, Imai A, Endo Shiori, Carey TE, Mineta H: Epigenetic Inactivation of Galanin and Galanin Receptor 1/2 associated with Clinical outcome in Head and Neck Cancer. *Clin Exp Metastasis*. 33(2): 187-95. 2016
8. Misawa K\*, Kawasaki H, Endo Shiori, Mochizuki D, Morita K, Hashimoto Y, Kikuchi H, Kanazawa T, Iwashita T, Mineta H: Primary combined small and squamous cell carcinoma of the hypopharynx: a case report. *Molecular and Clinical Oncology*. 4(5): 709-714. 2016

[学会発表](計11件)

- (1) 遠藤 志織, 杉山 健一, 瀧澤 義徳, 大和谷 崇, 水田 邦博, 峯田 周幸: 外耳道神経周膜腫の1例 第23回日本耳科学会 2013年11月24日 宮崎
- (2) 遠藤 志織, 水田 邦博, 大和谷 崇, 高橋 吾郎, 近藤 玄樹, 石川 竜司, 杉山 健一, 岡村 純, 瀧澤 義徳, 三澤 清, 峯田 周幸: 当科において小林式耳管ピン挿入を施行した耳管開放症症例の検討 第115回日本耳鼻咽喉科学会総会 2014年5月15日 福岡
- (3) 遠藤 志織, 榎本 美紀, 近藤 玄樹, 石川 竜司, 杉山 健一, 岡村 純, 瀧澤 義徳, 高橋 吾郎, 三澤 清, 大和谷 崇, 水田 邦博, 峯田 周幸: アデノイド・扁桃摘出後、血清 IGF-1 値を含め、成長経過を観察した SAS 合併低身長児の3例 第9回日本小児耳鼻咽喉科学会 2014年6月6日 浜松
- (4) 遠藤 志織, 三澤 由幾, 岡村 純, 高橋 吾郎, 杉山 健一, 瀧澤 義徳, 大和谷 崇, 三澤 清, 水田 邦博, 峯田 周幸: 外耳道に進展した小児深頸部膿瘍の2例 第76回耳鼻咽喉科臨床学会 2014年6月26日 盛岡
- (5) 遠藤 志織, 水田 邦博, 大和谷 崇, 高橋 吾郎, 美馬 勝人, 中安 一孝, 大久保 亜季, 野田 和洋, 石川 竜司, 岡村 純, 三澤 由幾, 三澤 清, 峯田 周幸: 外科的治療を要した難治性耳管開放症

症例の検討 第116回日本耳鼻咽喉科学  
会総会 2015年5月21日 東京

- (6) 遠藤 志織, 岡村 純, 三澤 由幾, 高橋  
吾郎, 三澤 清, 大和谷 崇, 水田 邦博,  
峯田 周幸: 切開排膿術を要した乳幼児  
頸部膿瘍の7症例 第77回耳鼻咽喉科  
臨床学会 2015年6月25日 浜松
- (7) 遠藤 志織, 中西 啓, 水田 邦博, 峯田  
周幸: 両側重度感音難聴をきたしたゴー  
シェ病の1例 第60回日本聴覚医学会  
2015年10月21日 東京
- (8) 三澤 清, 今井篤志, 遠藤志織, 望月大  
極, 三澤由幾, 高橋吾郎, 金澤文治, 峯  
田周幸: 頭頸部癌におけるオレキシン遺  
伝子の発現とプロモーター領域のメチ  
ル化との関連について 第115回日本耳  
鼻咽喉科学会総会 2014年5月15日 福  
岡
- (9) 三澤 清, 金澤文治, 今井篤志, 三澤由  
幾, 上原貴行, 遠藤志織, 望月大極, 杉  
山健一, 高橋吾郎, 峯田周幸: 頭頸部癌  
におけるソマトスタチン遺伝子の発現  
とプロモーター領域のメチル化との関  
連について 第114回日本耳鼻咽喉科学  
会総会 2013年5月16日 札幌
- (10) 三澤 清, 遠藤志織, 望月大極, 橋本雄  
一, 森田浩太郎, 細川誠二, 峯田周幸:  
下咽頭原発混合型小細胞癌症例の一例  
第75回耳鼻咽喉科臨床学会 2014年6  
月26日 盛岡
- (11) 三澤 清, 今井篤志, 望月大極, 遠藤志  
織, 近藤玄樹, 三澤由幾, 金澤文治, 峯  
田周幸: 頭頸部癌における  
neuropeptid FF 受容体遺伝子の発現と  
プロモーター領域のメチル化との関連  
について 第116回日本耳鼻咽喉科学会  
総会 2015年5月21日 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤志織 (ENDO, Shiori)

浜松医科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 10625205

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: